

Rec'd PCT/PTO 15 OCT 2006 PCT/JP 2004/005456

10/553320

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

16. 4. 2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

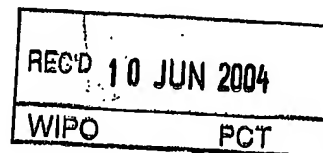
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2003年 7月11日  
Date of Application:

出願番号 特願2003-273177  
Application Number:

[ST. 10/C]: [JP 2003-273177]

出願人 千寿製薬株式会社  
Applicant(s):

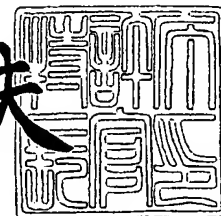


PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 5月28日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特2004-3045693

【書類名】 特許願  
【整理番号】 614-03  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 A61K 38/00  
A61P 27/02

【発明者】  
【住所又は居所】 兵庫県神戸市垂水区小東山本町2丁目21番1-902号  
【氏名】 高山 美子

【発明者】  
【住所又は居所】 兵庫県神戸市西区南別府4丁目366番地の1-106号  
【氏名】 中村 義邦

【発明者】  
【住所又は居所】 兵庫県神戸市須磨区白川字不計1番地の6 603号  
【氏名】 井上 淳

【発明者】  
【住所又は居所】 兵庫県西宮市満池谷町4番13-102号  
【氏名】 東 光佳

【特許出願人】  
【識別番号】 000199175  
【氏名又は名称】 千寿製薬株式会社

【代理人】  
【識別番号】 100118360  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 松田 玲子

【先の出願に基づく優先権主張】  
【出願番号】 特願2003-114819  
【出願日】 平成15年 4月18日

【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 004167  
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1  
【包括委任状番号】 0104918

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

R h o タンパク阻害剤を含有する角膜神経軸索伸展促進剤。

【請求項 2】

R h o タンパク阻害剤を含有する角膜知覚回復剤。

【請求項 3】

R h o タンパク阻害剤を含有するドライアイ治療剤。

## 【書類名】明細書

## 【発明の名称】角膜知覚回復剤

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は Rho タンパク阻害剤を含有する角膜神経軸索伸展促進剤、および角膜神経軸索伸展による角膜知覚の回復、改善、並びにドライアイの治療剤に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

レーザー屈折矯正角膜切除術 (PRK)、レーザー角膜切削形成術 (レーシック; LASIK)、角膜移植などの角膜手術後には、角膜神経が切断されるため、通常約3週間から1年間角膜知覚機能の低下症状が起きるといわれ、例えば、LASIK後の神経が存在しないかあるいは短い角膜領域において、角膜の知覚が低下することが報告されている (非特許文献1参照)。

一方、PRKおよびLASIK後の角膜知覚の低下が涙腺応答低下、涙液減少の原因であることが示唆されている (非特許文献2参照)。そしてこの角膜知覚機能低下のため角膜手術後の患者では瞬目回数が減少しドライアイ症状が認められることが問題となっている。

また、ドライアイ患者では、涙液機能の低下から角膜知覚の低下をもたらし、さらにこの角膜知覚の低下がさらなる涙液機能の低下と循環し、角膜表面の症状がさらに悪化することが問題となっている。

しかし、現在角膜手術後の角膜知覚の回復は自然回復に委ねられ、またドライアイの治療においても角膜知覚を回復させるための積極的治療は施されていないのが現状である。

また、神経麻痺性角膜症、角膜潰瘍、糖尿病性角膜症などの角膜神経変性を伴う疾患でも角膜知覚低下が引き起こされる。

## 【0003】

Rho タンパクは Rhoファミリー (Rho、Rac、Cdc42などを含む) に包含される低分子Gタンパクであり、アクチン細胞骨格形成や、神経突起退縮反応に関係することが知られている。例えば Rho タンパク阻害剤である C3 酵素はマウス脳腫瘍 C1300 系から分離・樹立された神経芽腫株化細胞の N1E-115 細胞の軸索伸展をもたらしことが知られている (非特許文献3参照)。

また Rho タンパク阻害剤の有効量を患者に投与することによって中枢神経軸索再生を促進する方法が開示されている (特許文献1参照)。Rho タンパクのエフェクター分子の一つである Rho キナーゼの阻害剤が網膜神経節細胞の軸索伸展作用を有し、視神経細胞の再生促進作用を有することが知られている (特許文献2参照)。

## 【0004】

三叉神経に対しては、ラット三叉神経組織培養 (trigeminal tract in wholmount cultures) 系での神経栄養因子などの神経成長因子 (NGF) 誘発神経軸索伸展が Rho 活性化剤 (リゾホスファチジン酸) で阻害され、ドミナントネガティブ Rho を細胞に導入することで促進されることが報告されている (非特許文献4参照)。その一方、神経栄養因子不存在下では、Rho が三叉神経軸索伸展に有効かどうかについては分からないとの記載があり、Rho タンパク阻害剤の三叉神経に対する効果についても未だ判明していない。

## 【0005】

一方、Rho 活性化作用を有する化合物が角膜上皮伸展作用を有し、Rho タンパク阻害剤である C3 酵素によってその角膜上皮の伸展が抑制されることから、Rho 活性化作用を有する化合物が、角膜潰瘍、角膜上皮剥離、角膜炎などの角膜障害に有用であることが開示されている (特許文献3参照)。

【特許文献1】特表 2001-515018 号公報

【特許文献2】国際公開第 2002/83175 号パンフレット

【特許文献3】特開 2000-264847 号公報

【非特許文献1】 ツーリ ユー. リナ. (Tuuli U. Linna)、他6名、インベスティゲイティブ オフサルモロジー アンド ビジュアル サイエンス (Investigative Ophthalmology & Visual Sciences)、2000年、41巻、p. 393-397

【非特許文献2】 ロバート ティー. アング. (Robert T. Ang)、他2名、カレント オピニオン オブ オフサルモロジー (Current Opinion of Ophthalmology)、2001年、12巻、p. 318-322

【非特許文献3】 エム. ウエハタ. (M. Uehata)、他9名、ザ ジャーナル オブ セル バイオロジー (The Journal of Cell Biology)、1998年、141巻、p. 1625-1636

【非特許文献4】 ピー. ハンデ オズディンラー (P. Hande Ozdinler)、他1名、ザ ジャーナル オブ コンパラティブ ニューロロジー (The Journal of Comparative Neurology)、2001年、438巻、p. 377-387

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

レーザー屈折矯正角膜切除術 (PRK)、レーザー角膜切削形成術 (レーシック; LASIK)、角膜移植などの角膜手術後などの角膜知覚機能低下や、ドライアイ患者における角膜知覚低下が回復する医薬を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、角膜手術後の角膜知覚回復やドライアイにおける角膜知覚症状を改善する新しいタイプの医薬を提供することを目的に検討を行ったところ、Rhoタンパク阻害剤が三叉神経 (以後、角膜神経ということもある。) 細胞の軸索伸展促進効果を有することを初めて見出し、これらの知見に基づいてさらに研究をすすめ、Rhoタンパク阻害剤を角膜知覚回復などの医薬として利用する本発明を完成した。

【0008】

すなわち、本発明は、

- (1) Rhoタンパク阻害剤を含有する角膜神経軸索伸展促進剤、
- (2) Rhoタンパク阻害剤を含有する角膜知覚回復剤、および
- (3) Rhoタンパク阻害剤を含有するドライアイ治療剤

に関するものである。さらに本発明は、上記医薬を製造する方法、角膜知覚を回復するための方法ならびに角膜神経軸索伸展促進、角膜知覚回復や、ドライアイのための組成物を提供するものである。

ここで、「Rhoタンパク阻害剤」とは、不活性型のGDP結合型Rhoタンパク質が活性型のGTP結合型Rhoタンパク質へと活性化されるのを阻害する全ての阻害剤、およびRhoタンパクまたはRhoタンパクフラグメントに対する抗体など、並びにRhoタンパクの作用を伝達するエフェクター分子、例えばRhoキナーゼ (ROCK) の働きを阻害するすべての阻害剤などをも包含するものである。「角膜神経」とは、知覚神経である三叉神経の支配をうけ角膜周囲に形成される輪状神経叢、角膜実質に網目上に分布する実質内神経叢、ボーマン膜直下で形成される上皮下神経叢、ボーマン膜を貫通したところで形成される基底細胞神経叢および神経線維をいう。本発明における「軸索」とは、ニューロン (神経細胞) の細胞体から出る突起 (樹状突起および軸索) をいい、「伸展」とは、細胞体から前記軸索が形成され、伸長することをいう。

【0009】

Rhoタンパク阻害剤としては、例えばC3細胞外酵素 (Exoenzyme C3、本明細書においては単にC3酵素ということもある。)、トキシンA (Toxin A) およびトキシンB (Toxin B) 並びにRhoキナーゼ阻害剤が挙げられる。

このうち、Rhoキナーゼ阻害剤 (以後、ROCK阻害剤ということもある。) としては、例えば特開昭61-227581号公報 (対応US4, 678, 738) に記載の化合物、例えばファスジルなどで代表されるイソキノリンスルホニル誘導体、WO00/5

7914号公報に記載の化合物、例えば4-[2-(2, 3, 4, 5, 6-ペンタフルオロフェニル)アクリロイル]桂皮酸およびエタクリン酸、WO02/76977号公報記載の化合物、例えば2-クロロ-6, 7-ジメトキシ-N-[5-(1)-インダゾリル]キナゾリン-4-アミンの合成などで示されるR h oキナーゼ阻害剤およびWO02/100833号公報に記載の化合物、例えばN-(1-ベンジル-4-ピペリジニル)-1H-インダゾール-5-アミン・2塩酸塩・1水和物などで示されるR h oキナーゼ阻害剤が挙げられる。

#### 【0010】

本発明の医薬は、哺乳動物（例えばヒト、ラット、マウス、ウサギ、ウシ、ブタ、イヌ、ネコなど）における角膜神経が障害、切断または欠損した、例えばPRKやLASIK後の低下した角膜知覚回復のための治療薬として、あるいは神経麻痺性角膜症、角膜潰瘍、糖尿病性角膜症などの角膜神経変性に伴う角膜知覚低下や角膜知覚の低下したドライアイの治療薬として有用である。

#### 【0011】

本発明化合物を含有する医薬は全身的または局所的に投与される。全身的には経口投与の他、静脈内注射、皮下注射、筋肉内注射など非経口的にも投与される。局所的には、眼に投与される。

#### 【0012】

本発明化合物を含有する医薬の製剤形態としては、粉末、顆粒、錠剤、カプセル剤、坐剤などの固形剤、およびシロップ剤、注射剤、点眼剤などの液剤などが挙げられる。顆粒および錠剤として製造する場合には、例えば賦形剤（乳糖、白糖、ブドウ糖、デンプン、結晶セルロースなど）、滑沢剤（ステアリン酸マグネシウム、タルク、ステアリン酸、ステアリン酸カルシウムなど）、崩壊剤（デンプン、カルメロースナトリウム、炭酸カルシウムなど）、結合剤（デンプン糊液、ヒドロキシプロピルセルロース液、カルメロース液、アラビアゴム液、ゼラチン液、アルギン酸ナトリウム液など）などを用いることにより任意の剤形を製造することができる。また、顆粒剤および錠剤には、適当なコーティング剤（ゼラチン、白糖、アラビアゴム、カルナバロウなど）、腸溶性コーティング剤（例えば酢酸フタル酸セルロース、メタアクリル酸コポリマー、ヒドロキシプロピルセルロースフタレート、カルボキシメチルエチルセルロースなど）などで剤皮を施してもよい。

#### 【0013】

カプセル剤として製造する場合には、適当な賦形剤、例えば流動性と滑沢性を向上させるためのステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、タルク、軽質無水ケイ酸など、また加圧流動性のための結晶セルロースや乳糖などの他、上記崩壊剤などを適宜添加したものを均等に混和または粒状もしくは粒状としたものに適当なコーティング剤で剤皮を施したものを充填するか、適当なカプセル基剤（ゼラチンなど）にグリセリンまたはソルビトールなどを加えて塑性を増したカプセル基剤で被包成形することもできる。これらカプセル剤には必要に応じて、着色剤、保存剤〔二酸化イオウ、パラベン類（パラオキシ安息香酸メチル、エチル、プロピルエステル）〕などを加えることができる。カプセル剤は通常のカプセルの他、腸溶性コーティングカプセル、胃内抵抗性カプセル、放出制御カプセルとすることもできる。腸溶性カプセルとする場合、腸溶性コーティング剤でコーティングした化合物または化合物に上記の適当な賦形剤を添加したものを通常のカプセルに充填または、カプセル自身を腸溶性コーティング剤でコーティング、もしくは腸溶性高分子を基剤として成形することができる。

#### 【0014】

坐剤として製造する場合には坐剤基剤（例えばカカオ脂、マクロゴールなど）を適宜選択して使用することができる。

#### 【0015】

シロップ剤として製造する場合、例えば安定剤（エドト酸ナトリウムなど）、懸濁化剤（アラビアゴム、カルメロースなど）、矯味剤（単シロップ、ブドウ糖など）、芳香剤などを適宜選択して使用することができる。

## 【0016】

本発明の医薬を注射剤または点眼剤として製造する場合、医薬上許容される添加物、例えば等張化剤（塩化ナトリウム、塩化カリウム、グリセリン、マンニトール、ソルビトール、ホウ酸、ホウ砂、ブドウ糖、プロピレングリコールなど）、緩衝剤（リン酸緩衝液、酢酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、炭酸緩衝液、クエン酸緩衝液、トリス緩衝液、グルタミン酸緩衝液、イプシロンアミノカプロン酸緩衝液など）、保存剤（パラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、ベンジルアルコール、塩化ベンザルコニウム、デヒドロ酢酸ナトリウム、エデト酸ナトリウム、ホウ酸、ホウ砂など）、増粘剤（ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコールなど）、安定化剤（亜硫酸水素ナトリウム、チオ硫酸ナトリウム、エデト酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、アスコルビン酸、ジブチルヒドロキシトルエンなど）、pH調整剤（塩酸、水酸化ナトリウム、リン酸、酢酸など）などを適宜添加した溶液に溶解または分散することによって製造することができる。

## 【0017】

上記シロップ剤、注射剤および点眼剤における添加剤の添加量は、添加する添加剤の種類、用途などによって異なるが、添加剤の目的を達成し得る濃度を添加すればよく、等張化剤は、通常、浸透圧が約229～約343mOsmとなるよう、約0.5～約5.0w/v%を添加する。また、緩衝剤は約0.01～約2.0w/v%程度、増粘剤は約0.01～約1.0w/v%程度、安定化剤は約0.001～約1.0w/v%程度になるように添加する。pH調整剤は、適宜添加し、通常pH約3～約9、好ましくは約4～約8になるように添加する。

特に点眼剤として使用する場合、Rhタンパク阻害剤の濃度は、通常下限は約0.00001w/v%、約0.00005w/v%、約0.0001w/v%であり、上限は約0.1w/v%、約0.05w/v%、約0.01w/v%、約0.005w/v%、約0.001w/v%に調製される。

## 【0018】

本発明化合物の投与量は対象となる疾患、症状、投与対象、投与方法などにより異なるが、例えばPRK手術後の角膜知覚回復剤として成人の眼に局所的に使用する場合には、例えばC3酵素約0.001w/v%含有する点眼液を、1回約20～約50μL、1日数回点眼するのがよい。

## 【発明の効果】

## 【0019】

本発明のRhタンパク阻害剤を含有する医薬は三叉神経細胞の軸索伸展促進作用を有することから、角膜神経の損傷などに伴う角膜知覚機能低下の改善および角膜知覚機能低下に伴うドライアイ症状の改善に有用である。具体的には、Rhタンパク阻害剤を適用することにより、白内障手術後やLASIK手術後の角膜知覚の低下、神経麻痺性角膜症、角膜潰瘍、糖尿病性角膜症などの角膜神経変性に伴う角膜知覚低下やドライアイ症状の改善効果が期待できる。

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0020】

本発明を以下の試験例及び実施例に従いさらに詳細に説明するが、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。

## 【実施例】

## 【0021】

試験例1. C3酵素のウサギ三叉神経の軸索伸展促進作用

## 1) 使用動物

福岡養兔組合より購入した日本白色種ウサギ（生後2～3日）を使用した。

## 2) 試験物質

C3酵素 [upstate社製; Exoenzyme C3 (recombinant enzyme expressed in E. coli) ; Catalog #13-118, Lot #23330]

## 【0022】

## 3) 試験方法

細胞培養: 三叉神経細胞の単離はKwanらの報告 (Kwan Y. Chan and Richard H. Haschke. *Exp. Eye Res.* 41: 687-699, 1985) を参考にして行った。すなわち、エーテル麻酔下、生理食塩水で心臓灌流後、三叉神経節を切り出し、神経分散液 (住友ベークライト社製) を用いて、三叉神経節を分散させた後、ポリリシンでコートした8ウェルカルチャースライド (BECTON DICKINSON製) に細胞を播種した。細胞数は1ウェルあたり約  $3 \times 10^3$  細胞とし、培養条件は5%  $\text{CO}_2$ 、95%空気下、37℃とした。細胞培養にはニューロベサル培養液 (GIBCO社製) にB27 Supplement (GIBCO社製; 0.02 mL/mL培養液) およびL-グルタミン酸 (GIBCO社製; Fin. 1 mM) を添加した培養液を用い、細胞播種直後にC3酵素 ( $2 \mu\text{g/mL}$  最終濃度) を添加して24時間培養した。

免疫染色: 培養24時間後に、細胞を4%パラホルムアルデヒドで、室温で2時間固定し、神経細胞に特異的な中間径フィラメントであるニューロフィラメントを特異的に認識する抗ニューロフィラメント200抗体 (Sigma社製) を用いて神経細胞体および軸索を蛍光染色した。染色細胞は蛍光顕微鏡からコンピュータに画像 (1画像:  $1.83 \text{ mm} \times 1.36 \text{ mm}$ ) として取り込み、画像中の全細胞数 ( $t_k$ ) をカウントすると共に、画像解析ソフト (MacSCOPE, MITANI CO.) を用いて細胞の軸索の長さを測定し、細胞体の直径の2倍以上長さの軸索を持つ細胞を神経軸索伸展細胞 ( $a_k$ ) としてカウントした。各ウェルについて画像中の全細胞数の合計 ( $t_1 + t_2 + \dots + t_n = \Sigma t_k$ ) が約100となるまで画像を取り込んだ。その時の総神経軸索伸展細胞 ( $a_1 + a_2 + \dots + a_n = \Sigma a_k$ ) の全細胞数 ( $\Sigma t_k$ ) に対する比率 (%) を計算した。無添加群 (コントロール群; 3ウェル) およびC3酵素添加群 (3ウェル) の各ウェルの比率から平均値±標準誤差を求め、無添加群 (コントロール群) に対する有意差検定 (t-test) を行い、危険率5%未満を有意であると判定した。

## 【0023】

## 4) 試験結果

図1はC3酵素によるウサギ三叉神経の軸索伸展促進効果を示している。図1中、AはC3酵素無添加培養液で24時間培養したコントロール群の細胞を、BはC3酵素を最終濃度  $2 \mu\text{g/mL}$  添加した培養液で24時間培養した細胞を、図2はコントロール群およびC3酵素添加群における、各群の全細胞数に対する軸索伸展細胞数の比率を示す。

軸索伸展細胞の比率はコントロール群では全細胞の約21%、C3酵素添加群では全細胞の約46%であり、C3酵素添加により軸索伸展細胞数の有意な増加が認められた (図2)。

以上のことから、Rho阻害活性を有するC3酵素は三叉神経細胞の軸索伸展を促進することが分った。

## 【0024】

## 試験例2. ROCK阻害剤のウサギ三叉神経の軸索伸展促進作用

## 1) 使用動物

北山ラベスより購入した日本白色種ウサギ (生後2~3日) を使用した。

## 2) 被験物質

ROCK阻害剤として、2-クロロ-6, 7-ジメトキシ-N-[5-(1-インダゾリル)キナゾリン-4-アミン、N-(1-ベンジル-4-ピペリジニル)-1H-インダゾール-5-アミン・2塩酸塩、4-[2-(2, 3, 4, 5, 6-ペンタフルオロフェニル)アクリロイル]桂皮酸および塩酸ファスジルを使用した。

2-クロロ-6, 7-ジメトキシ-N-[5-(1-インダゾリル)キナゾリン-4-アミン (以下、化合物1と記載する。)] はWO02/76977号公報、実施例1の記載に従い合成したものを使用した。N-(1-ベンジル-4-ピペリジニル)-1H-インダゾール-5-アミン・2塩酸塩 (以下、化合物2と記載する。)] はWO02/100833号公報、実施例1の記載に従い合成したものを使用した。4-[2-(2, 3, 4, 5, 6-ペンタフルオロフェニル)アクリロイル]桂皮酸 (以下、化合物3と記載する。)] は



特開 2000-44513 号公報、実施例 8 の記載に従い合成したものを使用した。塩酸ファスジル（以下、化合物 4 と記載する。）は市販の塩酸ファスジル水和物注射液「エリル注 30 mg」（旭化成株式会社製造販売）を使用した。

#### 【0025】

##### 3) 細胞培養

ウサギ三叉神経細胞の単離は Kwan らの報告 (Kwan Y. Chan and Richard H. Haschke. *Exp. Eye Res.*, 41: 687-699, 1985.) を参考にして行なった。すなわち、エーテル麻酔下、生理食塩水で心臓灌流を施した後、三叉神経節を切り出し、切り出した三叉神経節を神経分散液（住友ベークライト社製）を用いて分散させることにより、ウサギ三叉神経節細胞を調製した。

細胞培養にはニューロベーサル培養液 (GIBCO 社製) に B27 Supplement (GIBCO 社製; Fin. 2% v/v) および L-グルタミン (GIBCO 社製; Fin. 1 mM) を添加した培養液を用い、24 ウェルプレートの各ウェルにポリリシン/ラミニンコーティング済み円形カバーガラス（直径 12 mm; 住友ベークライト社製）を入れ、そのカバーガラス上に約  $3 \times 10^3$  細胞/ウェルとなるように細胞を播種した。細胞がカバーガラスに接着後（約 2 時間）、上記培養液をそれぞれの被験物質添加培養液（化合物 1; 最終濃度  $10 \mu\text{M}$ , 化合物 2; 最終濃度  $10 \mu\text{M}$ , 化合物 3; 最終濃度  $1 \mu\text{M}$ , 化合物 4; 最終濃度  $10 \mu\text{M}$ ）に交換し、48 時間培養した。培養条件は、5%  $\text{CO}_2$  - 95%  $\text{air}$ , 湿度 100%, 温度  $37^\circ\text{C}$  で行った。

#### 【0026】

##### 4) 免疫染色

培養 48 時間後の細胞を 4% パラホルムアルデヒドを用いて室温で 2 時間固定した。

神経細胞に特異的な中間径フィラメントであるニューロフィラメントを認識する抗ニューロフィラメント 200 抗体 (Sigma 社製) を用いて固定した標本を蛍光染色し、蛍光顕微鏡を用いて染色された細胞を検出した。染色像は、コンピュータに画像（1 画像:  $1.83 \text{ mm} \times 1.36 \text{ mm}$ ）として取り込んだ。画像中の全細胞数 ( $t_k$ ) をカウントすると共に、画像解析ソフト (MacSCOPE, MITANI CO.) を用いて細胞の軸索伸展長および細胞体直径を測定し、細胞体直径の 2 倍以上長さの軸索を有する細胞を神経軸索伸展細胞 ( $a_k$ ) としてカウントした。各ウェルについて、画像中の全細胞数の合計 ( $t_1 + t_2 + \dots + t_n = \sum t_k$ ) が約 100 となるまで画像を取り込んだ。その時の総神経軸索伸展細胞 ( $a_1 + a_2 + \dots + a_n = \sum a_k$ ) の全細胞数 ( $\sum t_k$ ) に対する比率 (%) を計算した。無添加群（コントロール群; 3 ウェル）および被験物質添加群（各 3 ウェル）の各ウェルの比率から平均値 ± 標準誤差を求め、無添加群（コントロール）と被験物質添加群との比較を Dunnett 多重比較検定法により行ない、危険率 5% 未満を有意であると判定した。

#### 【0027】

##### 6) 試験結果

図 3 に ROCK 阻害剤のウサギ三叉神経細胞の軸索伸展促進効果を示す。

図 3 A は、被験物質無添加培養液で 48 時間培養した細胞を、図 3 B は化合物 1 を添加した培養液で 48 時間培養した細胞を、図 3 C は化合物 2 を添加した培養液で 48 時間培養した細胞を、図 3 D は化合物 3 を添加した培養液で 48 時間培養した細胞を、図 3 E は化合物 4 を添加した培養液で 48 時間培養した細胞を示している。

図 4 は、全細胞数に対する無添加群およびそれぞれ被験物質添加群の神経軸索伸展細胞の比率を示している。全細胞に対する神経軸索伸展細胞の比率は、無添加群で約 31%、化合物 1 添加群で約 41%、化合物 2 添加群で約 57%、化合物 3 添加群で約 51%、化合物 4 添加群で約 70% であり、被験物質添加群では神経軸索伸展細胞比率の有意な増加あるいは増加傾向が認められた。

以上の結果から ROCK 阻害剤は、三叉神経細胞の軸索伸展を促進する作用を有することが明らかとなった。

#### 【0028】

参考例 1 2-クロロ-6, 7-ジメトキシ-N-[5-(1-インダゾリル)]キナゾ

リン-4-アミンの合成 (WO 02/76977号公報、実施例1)

2, 4-ジクロロ-6, 7-ジメトキシキナゾリン (8.6 g, 64.58 mmol)、5-アミノインダゾール (4.8 g, 36.04 mmol) および酢酸カリウム (7.351 g, 74.91 mmol) をテトラヒドロフラン/精製水 (138 mL/62 mL) 中に加え、一晩室温下で撹拌した。混合物に精製水 (130 mL) を加え、結晶を析出させた。析出した結晶は精製水で洗浄し、DMF-水から再結晶し目的とする2-クロロ-6, 7-ジメトキシ-N-[5-(1-インダゾリル)]キナゾリン-4-アミンの微黄色粉末を得た。

mp 278.7-283.8 °C. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 3.93 (s, 3H), 3.96 (s, 3H), 7.16 (s, 1H), 7.60 (m, 2H), 7.90 (s, 1H), 8.03 (s, 1H), 8.12 (s, 1H), 9.94 (s, 1H), 13.13 (br s, 1H). Anal. Calcd. for C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>Cl · 1/2H<sub>2</sub>O: C, 55.97, H, 4.14, N, 19.20. Found: C, 56.05, H, 4.46, N, 19.22.

#### 【0029】

参考例2 N-(1-ベンジル-4-ピペリジニル)-1H-インダゾール-5-アミン・2塩酸塩の合成 (WO 02/100833号公報、実施例1)

N-(1-ベンジル-4-ピペリジニル)-1H-インダゾール-5-アミンの合成

1-ベンジル-4-ピペリジニル (14.21 g, 75.1 mmol, 13.92 mL) の1, 2-ジクロロエタン (80 mL) 溶液中に、室温にて5-アミノインダゾール (10.0 g, 75.10 mmol)、トリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム (11.5 g, 52.6 mmol)、酢酸 (4.29 mL, 75.1 mmol) を加え、室温にて終夜撹拌した。次に、反応液を1N-水酸化ナトリウム水溶液に注ぎ、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄してから、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を減圧留去して得られた残渣をメタノールから再結晶することにより、N-(1-ベンジル-4-ピペリジニル)-1H-インダゾール-5-アミン (7.8 g, 34%) を得た。

mp 150.1-152.2 °C. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 1.39 (m, 2H), 1.94 (m, 2H), 2.08 (t, 2H, J = 10.8), 2.79 (d, 2H, J = 11.4), 3.19 (m, 1H), 3.47 (s, 3H), 5.11 (d, 1H, J = 7.8), 6.68 (br s, 1H), 6.83 (dd, 1H, J = 8.9, 1.7), 7.20-7.37 (m, 6H), 12.58 (br s, 1H). Anal. Calcd. for C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>: C, 74.48, H, 7.24, N, 18.29. Found: C, 74.42, H, 7.27, N, 18.37

#### 【0030】

得られたN-(1-ベンジル-4-ピペリジニル)-1H-インダゾール-5-アミン (6.0 g, 19.58 mmol) のテトラヒドロフラン (60 mL) 溶液中に、室温にて1N-塩酸/エーテル (38 mL) および4N-塩酸/酢酸エチル (13 mL) を加え、室温にて30分間撹拌した。析出した固体を濾取し、メタノールから再結晶することにより、N-(1-ベンジル-4-ピペリジニル)-1H-インダゾール-5-アミン・2塩酸塩 (4.32 g, 56%) を得た。

mp 193.0-194.6 °C. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 2.18 (m, 1.75H), 2.51 (m, 0.25H), 2.98 (m, 1.5H), 3.17 (m, 0.5H), 3.41 (m, 2H), 3.68 (m, 0.75H), 3.90 (m, 0.25H), 4.25 (m, 1.5H), 4.46 (m, 0.5H), 7.40-7.64 (m, 6H), 7.59 (m, 1H), 7.70 (m, 1H), 7.92 (m, 1H), 8.20 (s, 1H), 11.02 (br s, 0.75H), 11.53 (br s, 0.25H). Anal. Calcd. for C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>·2HCl · 1/2H<sub>2</sub>O: C, 58.76, H, 6.49, N, 14.43. Found: C, 58.49, H, 6.48, N, 14.45.

#### 【0031】

参考例3 4-[2-(2, 3, 4, 5, 6-ペンタフルオロフェニル)アクリロイル]桂皮酸の合成 (特開 2000-44513号公報、実施例8)

(1) 窒素雰囲気下、ドライアイスで冷却しながら、イソブテン (27 mL) に (2, 3, 4, 5, 6-ペンタフルオロフェニル) 酢酸 (20 g, 93.5 mmol)、エーテル (7 mL) および濃硫酸 (0.5 mL) を加え、耐圧管中、室温で3日間撹拌した。10%炭酸水素ナトリウム水溶液と氷の混合物に、ドライアイスで冷却した反応液を加え撹拌した。エーテルを加えて抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで

乾燥後、減圧濃縮し、(2, 3, 4, 5, 6-ペンタフルオロフェニル) 酢酸 t-ブチルエステル (24.4 g, 97%) を得た。

#### 【0032】

(2) 4-ホルミル安息香酸 (20 g, 0.133 mol) のピリジン (138 mL) 溶液にマロン酸エチルモノカリウム塩 (46 g, 0.270 mol)、p-トルエンスルホン酸一水和物 (50 g, 0.263 mol) およびピペリジン (2.0 mL) を加え、混合液を徐々に加熱したのち 120℃ で 1.5 時間撹拌した。氷冷下、反応液に 2 N 塩酸を加えて酸性とし、析出物を濾取することにより 4-カルボキシ桂皮酸 エチルエステル (26.58 g, 91%) を結晶として得た。

窒素雰囲気下、4-カルボキシ桂皮酸 エチルエステル (5.0 g, 22.7 mmol) のクロロホルム (15 mL) 溶液に塩化チオニル (8.4 mL) を滴下したのち、ジメチルホルムアミド (1 滴) を加え 30 分間加熱還流した。反応液を減圧濃縮し酸クロライドを得た。

#### 【0033】

(3) 窒素雰囲気下、上記 (1) で得た (2, 3, 4, 5, 6-ペンタフルオロフェニル) 酢酸 t-ブチルエステル (6.35 g, 23.5 mmol) のテトラヒドロフラン (100 mL) 溶液に、ドライアイスで冷却しながらリチウムビス(トリメチルシリル)アミドの 1 M トルエン溶液 (26 mL) を滴下した。5 分後、さらに上記 (2) で得た酸クロライドのテトラヒドロフラン (100 mL) 溶液を滴下した。滴下終了 20 分後に、室温で 1.5 時間撹拌した。反応液に 5% クエン酸水溶液 (120 mL) を加え、エーテルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後減圧濃縮した。得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトで精製し、14-[(2RS)-2-(t-ブトキシカルボニル)-2-(2, 3, 4, 5, 6-ペンタフルオロフェニル)アセチル]桂皮酸 エチルエステル (4.83 g, 44%) を結晶として得た。

#### 【0034】

(4) 上記 (3) で得た 4-[(2RS)-2-(t-ブトキシカルボニル)-2-(2, 3, 4, 5, 6-ペンタフルオロフェニル)アセチル]桂皮酸 エチルエステル (5.6 g, 11.6 mmol) のジオキサン (24 mL) 溶液を耐圧管に入れ、濃塩酸 (24 mL) を加える。130℃ に加熱しながら 4 時間撹拌した。反応液を氷冷して析出物を濾取し、4-[(2, 3, 4, 5, 6-ペンタフルオロフェニル)アセチル]桂皮酸 (3.7 g, 90%) を結晶として得た。この 4-[(2, 3, 4, 5, 6-ペンタフルオロフェニル)アセチル]桂皮酸 (2.03 g, 5.7 mmol) のジオキサン (115 mL) 溶液を耐圧管に入れ、パラホルムアルデヒド (0.7 g)、ジメチルアミン塩酸塩 (1.86 g, 22.8 mmol)、酢酸 (10 滴) および無水硫酸マグネシウム (8 g) を加えて 130℃ に加熱しながら一晩撹拌した。氷冷下、反応液に 0.1 N 塩酸を加えて酸性とし酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄、無水硫酸マグネシウムで乾燥後減圧濃縮した。析出物を濾取し、標記化合物 1.46 g (93%) を結晶として得た。  
mp 214.0-217.0 °C. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.25 (s, 1H), 6.30 (s, 1H), 6.46 (d, 1H, J = 16.2), 7.57 (d, 2H, J = 8.4), 7.64 (d, 1H, J = 15.9), 7.78 (d, 2H, J = 8.4)

#### 【0035】

##### 実施例 1 錠剤

C3 酵素	10 mg
乳糖	80 mg
デンプン	17 mg
ステアリン酸マグネシウム	3 mg
結晶セルロース	10 mg

以上の成分を 1 錠分の材料として、常法により錠剤を成形する。錠剤は必要に応じて通常用いられる腸溶性コーティング剤 (例えばフタル酸ヒドロキシプロピルメチルセルロースなど)、糖衣およびフィルム (例えばエチルセルロース) を適用してもよい。主薬成分

であるC3酵素を、化合物1、2、3又は4に変え、また添加剤との配合比を変えることにより、主薬の成分量が20mg、5mg、1mg、0.5mg、0.1mg/錠の錠剤を調製することができる。

## 【0036】

## 実施例2 カプセル剤

C3酵素	50 mg
マンニトール	75 mg
デンプン	17 mg
ステアリン酸カルシウム	3 mg

以上の成分を1カプセル剤の材料として均一に混合し、常法により顆粒状とし、硬カプセルに充填する。この充填する前に必要に応じて顆粒は通常用いられる腸溶性コーティング剤（例えばフタル酸ヒドロキシプロピルメチルセルロース）、糖衣またはフィルム（例えばエチルセルロース）を適用してもよい。主薬成分であるC3酵素を、化合物1、2、3又は4に変え、また添加剤との配合比を変えることにより、主薬の成分量が20mg、10mg、5mg、1mg、0.5mg、0.1mg/カプセルのカプセル剤を調製することができる。

## 【0037】

## 実施例3 注射剤

C3酵素	750 mg
カルボキシメチルセルロースナトリウム	500 mg
注射用水	全量 100 mL

以上の成分を常法により無菌的に混和して注射剤を調製する。主薬成分であるC3酵素を、化合物1、2、3又は4に変え、また添加剤の配合比を変えることにより、主薬の成分量が1000mg、500mg、200mg、100mg/100mLである注射剤を調製することができる。

## 【0038】

## 実施例4 点眼剤

C3酵素	5 mg
ホウ酸	700 mg
ホウ砂	適量 (pH 7.0)
塩化ナトリウム	500 mg
ヒドロキシメチルセルロース	0.5 g
エデト酸ナトリウム	0.05 mg
塩化ベンザルコニウム	0.005 mg
滅菌精製水	全量 100 mL

滅菌精製水80mLを約80℃まで加温し、ヒドロキシメチルセルロースを加えて攪拌し、液温を室温まで戻す。この液にC3酵素、塩化ナトリウム、ホウ酸、エデト酸ナトリウムおよび塩化ベンザルコニウムを加えて溶解する。ホウ砂を適量加えてpHを7に調整する。滅菌精製水を加えて100mLまでメスアップする。主薬成分であるC3酵素を、化合物1、2、3又は4に変え、また添加剤の配合比を変えることにより、主薬の濃度が1w/v%、0.5w/v%、0.3w/v%、0.1w/v%、0.05w/v%、0.01w/v%、0.003w/v%、0.001w/v%である点眼剤を調製することができる。

## 【0039】

## 実施例4 点眼剤

C3酵素	10 mg
D-マンニトール	4.5 g
リン酸二水素ナトリウム	0.1 g
水酸化ナトリウム	適量 (pH 7.0)
滅菌精製水	全量 100 mL

滅菌精製水 80 mL に C3 酵素、D-マンニトール、リン酸二水素ナトリウムを加えて溶解する。水酸化ナトリウムを適量加えて pH を 5.0 に調整する。滅菌精製水を加えて 100 mL までメスアップする。調製した点眼剤をメンブランフィルターで滅菌後、ディスポーザブル（ユニットドース）容器に充填、密封する。主薬成分である C3 酵素を、化合物 1、2、3 又は 4 に変え、また添加剤の配合比を変えることにより、主薬の濃度が 1 w/v %、0.5 w/v %、0.3 w/v %、0.1 w/v %、0.05 w/v %、0.01 w/v %、0.003 w/v %、0.001 w/v % である点眼剤を調製することができる。

【図面の簡単な説明】

【0040】

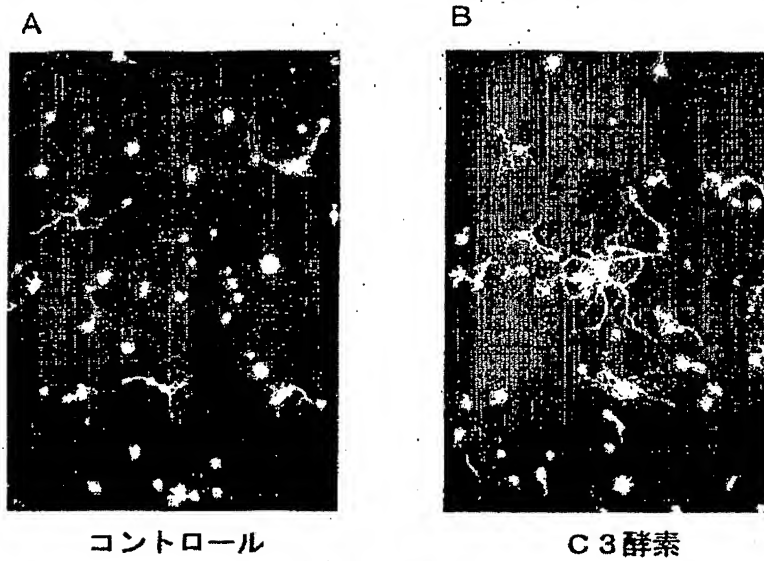
【図 1】試験例 1 におけるウサギ三叉神経の軸索伸展を示す図である。A は C3 酵素無添加培養液で 24 時間培養したウサギ三叉神経細胞を、B は C3 酵素を最終濃度 2  $\mu\text{g/mL}$  になるよう添加した培養液で 24 時間培養した細胞を示している。

【図 2】試験例 1 における神経軸索伸展細胞の全細胞数に対する比率（%）を示す。縦軸は全細胞に対する神経軸索伸展細胞の割合を示す。各値は 3 ウェルの平均値 ± 標準誤差を示す。図中 \* はコントロールに対する有意差（ $p < 0.05$ ）を示す。

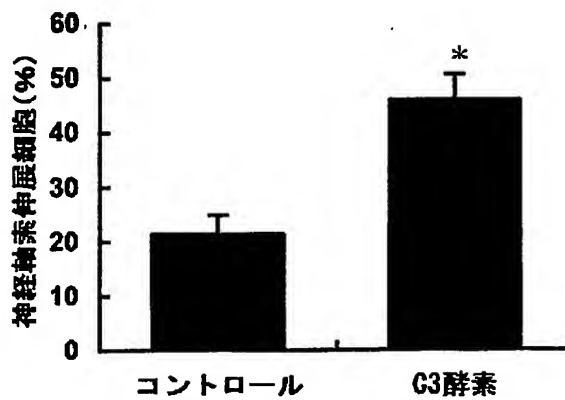
【図 3】試験例 2 におけるウサギ三叉神経の軸索伸展を示す図である。A は被験物質無添加培養液、B は化合物 1 添加（最終濃度 10  $\mu\text{M}$ ）培養液、C は化合物 2 添加（最終濃度 10  $\mu\text{M}$ ）培養液、D は化合物 3 添加（最終濃度 1  $\mu\text{M}$ ）培養液、E は化合物 4 添加（最終濃度 10  $\mu\text{M}$ ）培養液で 48 時間培養したウサギ三叉神経細胞を示す。

【図 4】試験例におけるカウントした全細胞数に対する神経軸索伸展細胞の比率（%）を示すグラフである。縦軸は全細胞に対する神経軸索伸展細胞の割合を示す。各値は 3 ウェルの平均値 ± 標準誤差を示す。図中 \* は無添加群に対する有意差  $p < 0.05$  を、\*\* は無添加群に対する有意差  $p < 0.01$  を示す。

【書類名】 図面  
【図 1】

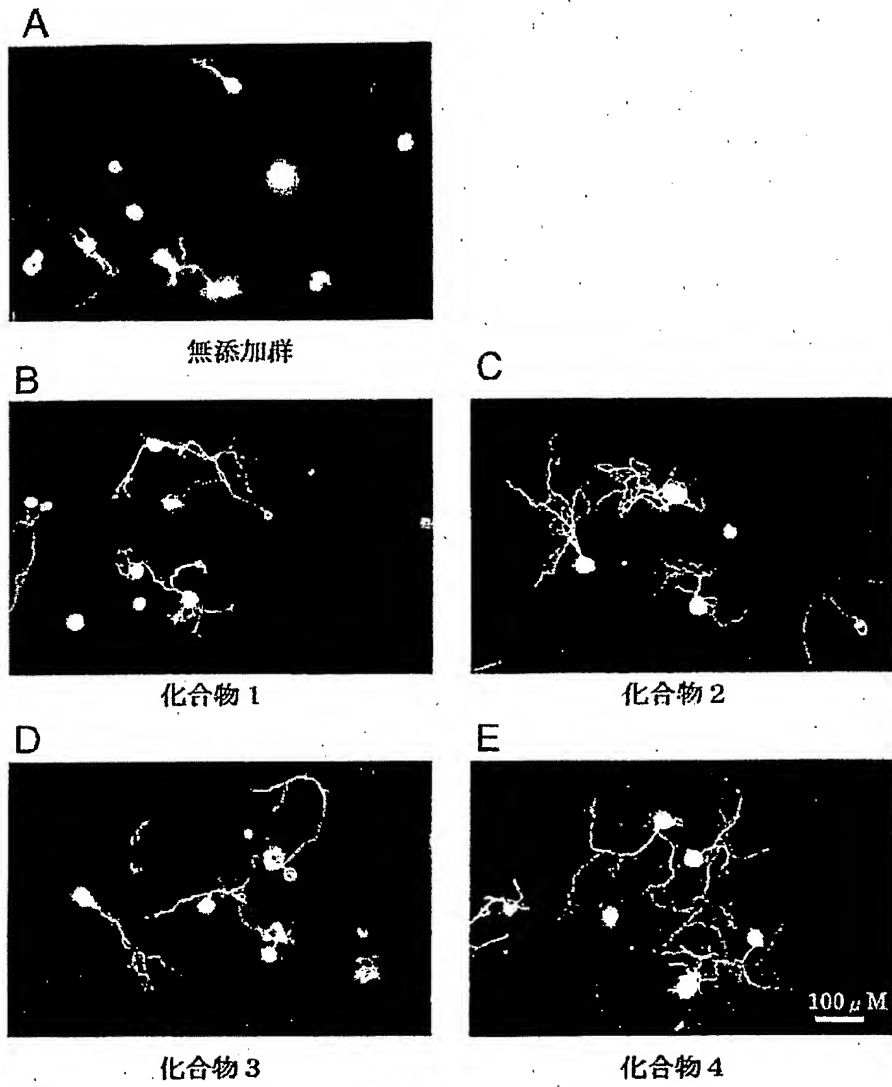


【図 2】



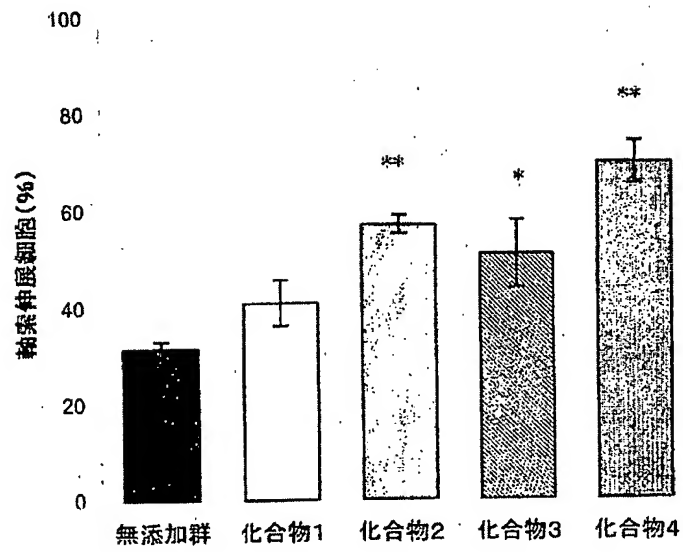
BEST AVAILABLE COPY

【図 3】



BEST AVAILABLE COPY

【図 4】



BEST AVAILABLE COPY



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 本発明は、角膜の術後の角膜知覚回復やドライアイの症状を改善する新しいタイプの医薬を提供することである。

【解決手段】 R h o タンパク阻害剤を適用することにより、白内障手術後、LASIK手術後、神経麻痺性角膜症、角膜潰瘍、糖尿病性角膜症などの角膜神経変性に伴う角膜知覚低下、ドライアイ症状の改善に有用である。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2003-273177
受付番号	50301150593
書類名	特許願
担当官	笹川 友子 9482
作成日	平成15年 7月17日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成15年 7月11日

特願 2003-273177

出願人履歴情報

識別番号

[000199175]

1. 変更年月日

1990年 8月22日

[変更理由]

新規登録

住所

大阪府大阪市中央区平野町2丁目5番8号

氏名

千寿製薬株式会社